

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IFW

In re application of:

Attorney Docket No.: 026073-00005

RICCI *et al.*

Confirmation No. 5990

Application Serial No. 10/580,851

Examiner:

Filing Date: May 26, 2006

Art Unit:

For: Method For Quantitative And Semi-Quantitative Detection Of L-Phenylalanine, L-Tyrosine, L-3, 4-Dihydroxyphenylalanine And Their Corresponding Keto-Acids, Phenylpyruvic Acid, 3-Hydroxyphenylpyruvic Acid And 3, 4-Dihydroxyphenylpyruvic Acid In Biological Fluids, Related Kits For Diagnosis And Monitoring Of Altered Metabolisms Of These Aminoacids

**CLAIM FOR PRIORITY**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

December 5, 2006

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested for the above-identified patent application and the priority provided in 35 U.S.C. §119 is hereby claimed:

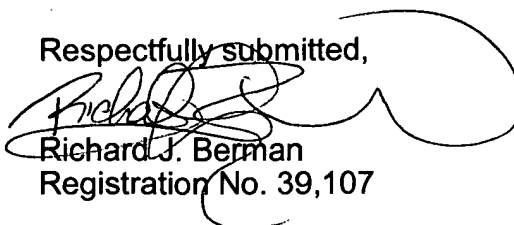
**RM 2003 A 000556 filed on November 26, 2004**

In support of this claim, certified copy of said original foreign application is filed herewith.

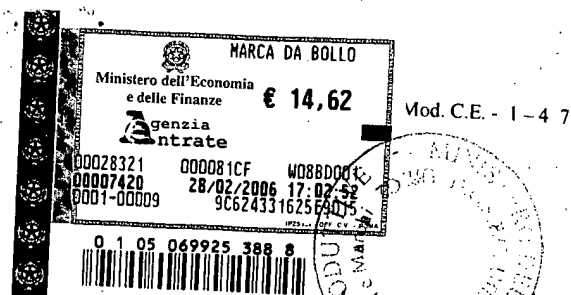
It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. §119 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of this document.

Please charge any fee deficiency or credit any overpayment with respect to this paper to Deposit Account No. 01-2300.

Respectfully submitted,

  
Richard J. Berman  
Registration No. 39,107

Customer No.: 004372  
Arent Fox PLLC  
1050 Connecticut Avenue, N.W., Suite 400  
Washington, D.C. 20036-5339  
Tel: (202) 857-6000/Fax: (202) 857-6395



# Ministero dello Sviluppo Economico

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:  
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2003 A 000556

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

**BEST AVAILABLE COPY**

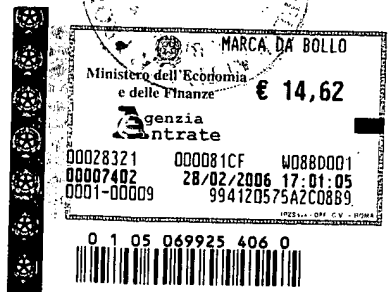
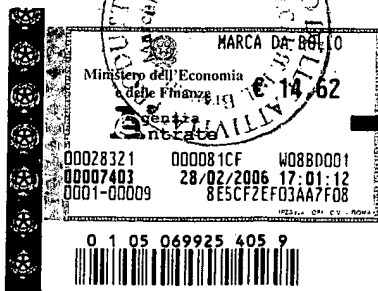
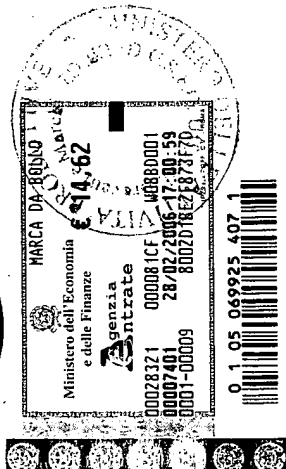
Si compone di pagg. 50.

Roma, li. **06 GIU. 2006**

**CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT**

*Giampietro Carlotto*

*Giampietro Carlotto*



## A. RICHIEDENTE(I)

1) Denominazione Universita' degli Studi di Roma "Tor Vergata" N.G. EIN  
 Residenza Roma, RM codice 02133971008  
 2) Denominazione \_\_\_\_\_  
 Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

Cognome e nome GITTO Serena ed altri Cod. fiscale \_\_\_\_\_  
 Denominazione studio di appartenenza Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.  
 Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 00187 (prov) RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 00187 (prov) RM

## D. TITOLO classe proposta (sez./cl/scl) \_\_\_\_\_ gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

"Metodo per la determinazione quantitativa e semiquantitativa di L-fenilalanina, L-tirosina, L-3,4-diidrossifenilalanina e dei loro corrispondenti chetoacidi nei fluidi biologici e relativo kit diagnostico".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒ SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_ N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome e nome

cognome e nome

1) RICCI Giorgio 3) RICCI Francesco  
 2) FEDERICI Giorgio 4) \_\_\_\_\_

## F. PRIORITÀ

nazione o  
organizzazioneTipo di  
priorità

numero di domanda

data di deposito

Allegato  
S/R

1) \_\_\_\_\_  
 2) \_\_\_\_\_

## SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N. Protocollo

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione \_\_\_\_\_

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es. \_\_\_\_\_  
 Doc. 1) 1 \_\_\_\_\_ n. pag. 40 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)  
 Doc. 2) 1 \_\_\_\_\_ n. tav. 08 disegno  
 Doc. 3) 1 \_\_\_\_\_ Lettera d' incarico  
 Doc. 4) 1 \_\_\_\_\_ designazione inventore  
 Doc. 5) \_\_\_\_\_ documenti di priorità con traduzione in italiano  
 Doc. 6) \_\_\_\_\_ autorizzazione o atto di cessione  
 Doc. 7) \_\_\_\_\_ nominativo completo del richiedente

## SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N° Protocollo

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Confronta singole priorità

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

8) attestati di versamento, totale Euro DUECENTONOVANTUNO /80 obbligatorio

COMPILATO IL 28 / 11 / 2003FIRMA DEL(I) Universita' degli Studi di Roma "Tor Vergata" **UN MANDATARIO**CONTINUA SI/NO NORICHIEDENTE(I) Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.**Serena Gitto**  
(N° d'iscr. 962 B)DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

CAMERA di COMMERCIO. IND. ART. e AGR. - \_\_\_\_\_

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA **RM 2003 A 000558**L'anno DUEMILATRE, il giorno VENTOTTO

, del mese di

NOVEMBREIl(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE  
ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE  
**L'Ufficiale Rogante**  
**Silvia Altieri**

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO 28/11/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE(I)

1) Denominazione

2) Denominazione

RM 2003 A 000556

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

D. TITOLO

"Metodo per la determinazione quantitativa e semiquantitativa di L-fenilalanina, L-tirosina,

L-3,4-diidrossifenilalanina e dei loro corrispondenti chetoacidi nei fluidi biologici e relativo kit diagnostico".

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

L'invenzione concerne un metodo per la determinazione quantitativa e semiquantitativa di L-fenilalanina, L-tirosina, L-3,4-diidrossifenilalanina e loro corrispondenti chetoacidi nei fluidi biologici e relativo kit diagnostico per la diagnosi ed il monitoraggio di dismetabolismi congeniti di detti amminoacidi

M.

RM 2003 A 000556

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"Metodo per la determinazione quantitativa e semiquantitativa di L-fenilalanina, L-tirosina, L-3,4-diidrossifenilalanina e dei loro corrispondenti chetoacidi nei fluidi biologici e relativo kit diagnostico"

Titolare: Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

Inventori: Giorgio RICCI, Giorgio FEDERICI, Francesco RICCI

\* \* \*

La presente invenzione concerne un metodo per la determinazione quantitativa e semiquantitativa di L-fenilalanina, L-tirosina, L-3,4-diidrossifenilalanina (L-DOPA) e dei loro corrispondenti chetoacidi nei fluidi biologici e il relativo kit diagnostico, in particolare, per la diagnosi ed il monitoraggio di dismetabolismi congeniti di detti amminoacidi. Più specificatamente, l'invenzione si riferisce ad un metodo per la determinazione quantitativa e semiquantitativa di L-fenilalanina, L-tirosina, L-3,4-diidrossifenilalanina e dei loro corrispondenti chetoacidi basato su una

ING. DARZANO & ZANNO ROMA SPA

interazione chimica specifica tra detti chetoacidi e alcuni derivati della fenazina.

E' noto che gli amminoacidi L-fenilalanina, L-tirosina ed L-3,4-diidrossifenilalanina sono normalmente presenti nei liquidi biologici quali prodotti del catabolismo proteico o sintetizzati ex novo da specifiche e ben note vie biosintetiche.

La loro concentrazione allo stato stazionario è finemente regolata da sistemi enzimatici ed ormonali ed un anomalo e persistente incremento della loro concentrazione ematica può essere legato a specifici difetti genetici o ad alterazioni nel funzionamento dei suddetti sistemi causate da farmaci o fattori ambientali.

Normalmente l'aumento della concentrazione di tali amminoacidi a livello ematico e cellulare determina anche un'aumentata escrezione dei loro prodotti di deaminazione ossidativa, ossia dei loro corrispondenti chetoacidi quali l'acido fenilpiruvico (PPA), l'acido 4-idrossifenilpiruvico (HPP) e l'acido 3,4 diidrossifenilpiruvico (DHPP).

Le principali patologie connesse con alterati livelli ematici di tali componenti sono la fenilchetonuria (PKU), l'iperfenilalaninemia non

fenilchetonurica, la tirosinosi, il neuroblastoma e il morbo di Parkinson.

La fenilchetonuria è una gravissima patologia ereditaria determinata dal difettoso funzionamento o dall'anomala sintesi dell'enzima L-fenilalanina idrossilasi, responsabile della conversione della L-fenilalanina in L-tirosina.

Tale patologia è caratterizzata da un incremento della L-fenilalanina serica ( $>1,2$  mM) e da una incrementata escrezione di fenilpiruvato nelle urine. L'elevata concentrazione di L-fenilalanina serica produce danni neurologici irreversibili e ritardo mentale. Una tempestiva diagnosi di tale patologia, entro due-tre settimane dalla nascita, consente di attivare precocemente una dieta alimentare a basso contenuto di L-fenilalanina, riducendo o eliminando i danni neurologici. A causa della elevata incidenza di tale patologia (1:10000) e della sua gravità, lo screening neonatale è raccomandato dal WHO ed è obbligatorio in molti paesi occidentali. Decine di milioni di neonati vengono analizzati ogni anno per tale patologia ed un elevato numero di pazienti fenilchetonurici adulti devono sottoporsi a frequenti controlli per l'ottimizzazione

ING. BARTOLINI 22-1-1979 1554 94

delle diete alimentari a basso contenuto di L-fenilalanina.

Attualmente sono molteplici le metodiche usate per lo screening neonatale della fenilchetonuria, per il controllo della terapia dietetica dei fenilchetonurici e per la conferma della diagnosi di positività ottenuta dai test di screening.

Ad esempio, il test semiquantitativo per il fenilpiruvato urinario viene impiegato per il controllo dietetico di fenilchetonurici conclamati. Il test può essere eseguito in soluzione o mediante Spot-Test su supporto di cellulosa, come ad esempio il test Phenistix ®, e si basa su una reazione colorimetrica dell'acido fenilpiruvico in ambiente acido con gli ioni ferrici. Il complesso verde che si forma è però caratterizzato da scarsa stabilità. Inoltre la reazione non è specifica, dando identica colorazione con differenti chetoacidi di origine organica. Il limite di determinazione per il fenilpiruvico urinario è di circa 0,6 mM.

Un altro metodo analitico di tipo semiquantitativo è rappresentato dal test microbiologico di Guthrie (Guthrie, R., Susi, A. (1963) Pediatrics 32, 338-343). Tale test, ampiamente impiegato in Italia ed in Europa per lo screening

ING. PIRELLA GÖTTSCHE LOWE

neonatale, rivela semiquantitativamente la concentrazione serica di L-fenilalanina basandosi sulla capacità di detto amminoacido di neutralizzare l'effetto di un antagonista metabolico di un mutante di *Bacillus subtilis*, la  $\beta$ -2-tienilalanina. Il limite di questo tipo di approccio è la rivelazione di numerosi "falsi positivi".

Un ulteriore metodo consiste nella determinazione fluorimetrica della L-fenilalanina serica (McCaman, M.N. and Robins, E. (1962) J. Lab. Clin. Med. 9, 885-890) come saggio di screening neonatale (Lubenow, N., Diepenbrock, F., Schickling, H. Bock, D., Heckler, R., Sander, J. (1994) Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 32, 525-528). Infatti, la L-fenilalanina in presenza del dipeptide L-leucil-L-alanina reagisce con la ninidrina formando un prodotto fluorescente con massimo di emissione a 515 nm ( $\lambda_{ex} = 365$  nm). Il saggio è previsto su campioni di sangue secco e analisi su micropiastre. Il test è preciso e accurato ma prevede almeno quattro, cinque ore di analisi e l'impiego di una specifica strumentazione.

La determinazione della L-fenilalanina mediante saggio spettrofotometrico si basa invece sulla deaminazione ossidativa della L-fenilalanina ad opera

della L-fenilalanina deidrogenasi (EC 1.4.1.20) in presenza di NAD<sup>+</sup>. Il NADH così prodotto viene dosato impiegando la diaforasi che trasferisce gli elettroni del NADH ad un accettore di elettroni come, ad esempio, il violetto di iodonitrotetrazolio che viene ridotto a sale di formazano. I formazani presentano assorbimenti specifici nella regione visibile attorno ai 500-580 nm e permettono di quantificare la concentrazione serica della L-fenilalanina mediante misure spettrofotometriche.

Questa tecnica colorimetrica, descritta nel 1992 (Dooley, K.C. (1992) Clin. Biochem. **25**, 271-276) e successivamente adattata per il monitoraggio della fenilalanina per spot ematici secchi (Randell, E.W. and Lehotay, D.C. (1996) Clin. Biochem. **29**, 133-138), presenta notevole accuratezza ma un limite di determinazione non molto inferiore alla concentrazione di L-fenilalanina serica accettata come valore cut-off per lo screening neonatale, cioè pari a 0,15 mM.

Inoltre per minimizzare il fenomeno della cross-reattività della L-tirosina serica, anch'essa substrato dell'enzima fenilalanina deidrogenasi, il saggio prevede che la reazione di ossidazione della L-fenilalanina avvenga a pH elevati e la riduzione

1992 Dooley K.C. Clin. Biochem. 25, 271-276  
1996 Randell E.W. and Lehotay D.C. Clin. Biochem. 29, 133-138

del sale di formazano a pH inferiore. Quindi, la procedura prevede due distinte fasi che complicano l'analisi.

Infine, un ulteriore metodo di determinazione della L-fenilalanina consiste nelle tecniche cromatografiche. In questi ultimi anni sono state messe a punto un certo numero di metodiche cromatografiche e tra queste alcune impiegano la cromatografia liquida ad alta pressione per separare la L-fenilalanina dopo derivatizzazione con o-ftalaldeide. Tale metodica impiega una colonna a fase inversa e un rivelatore a fluorescenza (Volmer, D.W., Jinks, D.C., Guthrie, R. (1990) Anal. Biochem. **189**, 115-121). La L-fenilalanina è stata anche determinata mediante elettroforesi zonale capillare (Tagliaro et al. (1994) Electrophoresis **15**, 94-97).

Le procedure sopra descritte presentano una buona sensibilità ma sono scarsamente impiegabili per analisi routinarie o per screening di massa poiché sono costose e richiedono apparecchiature analitiche non convenzionali e tempi di analisi dilatati. La spettrometria di massa (Sweetman, L. (1996) Clin. Chem. **42**, 345-346) e la spettrometria di risonanza magnetica nucleare (Novotny, E.J. et al. (1995) Ped. Res. **37**, 244-249) presentano inconvenienti analoghi.

L'iperfenilalaninemia non-fenilchetonurica è una patologia a decorso spesso benigno caratterizzata da un moderato incremento di L-fenilalanina serica ( $<1,2$  mM) che può essere causata da deficienza di tetraidrobiopterina. Data la asintomaticità di tale difetto metabolico, la iperfenilalaninemia non viene comunemente diagnosticata. Recenti studi hanno accertato che i neonati di madri iperfenilalaninemiche sono maggiormente esposti a microencefalie e hanno un quoziente intellettivo inferiore alla media (Platt, L.D. et al. (2000) Am J Obstet Gynecol 182, 326-33).

Tale patologia viene generalmente diagnosticata mediante l'analisi degli amminoacidi serici con metodiche convenzionali HPLC o mediante il succitato test di Guthrie.

La tirosinosi è una grave patologia dovuta a carenza dell'enzima 4-idrossifenilpiruvico ossidasi. Essa è caratterizzata da un aumento di L-tirosina serica e da una elevata escrezione urinaria dell'acido 4-idrossifenilpiruvico. Tale patologia, se non risulta fatale nell'infanzia, determina la cirrosi nel soggetto adulto.

La diagnosi della patologia può essere effettuata determinando l'acido 3-

idrossifenilpiruvico a livello urinario mediante il test colorimetrico di Millon, che però risulta essere scarsamente sensibile e specifico.

Risultati più accurati si ottengono determinando la L-tirosina mediante metodiche HPLC o mediante una specifica reazione con l'  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naftolo. Il prodotto è fluorescente e può essere determinato a 570 nm per eccitazione a 460 nm (Hsia, D., Y.-Y., Inouye, T. in "Inborn Errors of Metabolism" (Yearbook Medical Publisher, Inc) pp 69-71 (1966)).

Come è noto, il neuroblastoma rappresenta una grave forma tumorale che colpisce prevalentemente nell'infanzia ed è quasi sempre fatale. Recenti studi indicano che un anomalo incremento di L-DOPA serica e urinaria può essere indicativo di una fase precoce di questa patologia. Infatti, le colture cellulari di neuroblastoma arrestate al primo stadio dello sviluppo delle creste neurali presentano una carente attività L-DOPA decarbossilasica che può causare un accumulo serico e urinario di L-DOPA (Ikeda, H et al. (1995) Hypertens. Res. 18, S209-210) ed un incremento urinario di acido 2,3-diidrossifenilpiruvico.

Attualmente la L-DOPA viene determinata, dopo separazione su HPLC, con metodiche di tipo fluorimetrico mentre non sono note procedure

specifiche per la determinazione nel siero o nelle urine del corrispondente chetoacido, l'acido 2,3-diidrossifenilpiruvico.

Il morbo di Parkinson è una patologia neurodegenerativa invalidante dovuta ad una carente produzione di dopamina nel sistema nervoso centrale. Attualmente essa viene curata mediante somministrazione di L-DOPA che è il precursore metabolico della dopamina ed è in grado di superare la barriera ematoencefalica.

Una semplice metodica per il dosaggio urinario di L-DOPA o del suo prodotto catabolico, l'acido 2,3-diidrossifenilpiruvico, è auspicabile per ottimizzare i dosaggi delle somministrazioni di L-DOPA nei pazienti parkinsoniani. Ad oggi sono disponibili varie metodiche per la determinazione della L-DOPA molti dei quali basati su saggi spettrofotometrici, fluorimetrici, HPLC, alquanto complessi e dispendiosi in termini di tempo.

Alla luce di quanto sopra esposto risulta, pertanto, evidente l'esigenza di poter disporre di nuovi metodi per la quantificazione degli amminoacidi L-fenilalanina, L-tirosina ed L-3,4-diidrossifenilalanina e dei loro corrispondenti chetoacidi che siano veloci, semplici, sensibili e

1980-1981

consentano al tempo stesso di limitare i costi per la diagnosi ed il monitoraggio di dismetabolismi congeniti degli amminoacidi sopra menzionati.

Gli autori della presente invenzione hanno ora sorprendentemente trovato che alcuni sali organici derivati della fenazina quali, ad esempio, la fenazina metosolfato (PMS) e la fenazina etosolfato (PET) sono in grado di interagire specificatamente con i chetoacidi fenilpiruvico (PPA), 3-idrossifenilpiruvico (HPP) e 3,4-diidrossifenilpiruvico (DHPP) in ambiente alcalino, producendo un complesso dotato di elevato coefficiente di estinzione in una regione spettrale dove sia il PMS (o il PET) sia i suddetti chetoacidi non presentano assorbimenti apprezzabili. Pertanto tale reazione può essere vantaggiosamente impiegata sia per la determinazione quantitativa di detti chetoacidi, sia per la determinazione quantitativa degli amminoacidi precursori previamente trasformati in chetoacidi.

I sali organici derivati della fenazina sono caratterizzati da uno spettro di assorbimento con massimo centrato attorno ai 300 nm e sono largamente impiegati in campo biochimico in qualità di trasportatori di elettroni.

L'interazione specifica tra i sali organici derivati del PMS (o PET) ed i chetoacidi PPA, HPP e DHPP in ambiente alcalino (tra pH 7,0 e pH 10) produce un complesso a trasferimento di carica di colore azzurro che presenta notevole stabilità ed un elevato assorbimento della luce visibile che si traduce in un elevato coefficiente di estinzione molare con massimo di assorbimento a 663 nm. Tale reazione permette di evidenziare e quantificare sia in soluzione sia su supporto solido detti chetoacidi. Lo schema della reazione tra il PPA e il PMS è illustrata nella Figura 1.

La natura chimica del complesso PPA-PMS è stata confermata mediante spettrometria di massa del prodotto isolato mediante HPLC e successivamente cristallizzato che fornisce lo spettro di uno ione molecolare di massa 358 ed uno ione di massa 397 corrispondente al sale potassico del complesso.

Il complesso a trasferimento di carica si forma quantitativamente dopo alcuni minuti di incubazione a 25°C in presenza di alcuni eccessi molari di PMS.

La cinetica di reazione per la formazione del complesso a trasferimento di carica PPA-PMS dipende dalla concentrazione del tampone impiegato come

mostrato nella Tabella 1 ed è direttamente proporzionale alla concentrazione dei reagenti.

Tabella 1

Molarità del tampone fosfato (M)	Velocità iniziale a 663 nm ( $\Delta A/\text{min}$ ) (0,1 M PPA- 1 mM PMS)
1	0,19
0,5	0,15
0,1	0,05
0,05	0,03
0,01	0,005

Cinetica di formazione del complesso PMS-PPA in Tampone K-fosfato pH 8.5 a varie concentrazioni.

Inoltre, è stata saggiata la specificità di reazione dei sali organici derivati della fenazina con i suddetti chetoacidi incubando sia il PMS sia il PET con quindici tra i più importanti chetoacidi fisiologici tra i quali, ad esempio, l'acido piruvico, l'acido acetacetico, l'acido alfa-chetoglutarico, l'acido alfa-chetobutirrico. Alla concentrazione pari a 0,1 mM (PMS = 1 mM in T.F. pH 8,5) nessuno di detti chetoacidi produce apprezzabili variazioni spettrali a 663 nm.



Infine, l'uso di appropriate condizioni sperimentali quali l'impiego di differenti tamponi alcalini permette di ottenere informazioni quantitative sulla concentrazione dei singoli amminoacidi o chetoacidi anche se presenti simultaneamente, in funzione dei complessi di trasferimento di carica che si formano.

Infatti, gli autori della presente invenzione hanno osservato che il coefficiente di estinzione

molare ( $\epsilon$ ) del complesso tra i derivati della fenazina ed i suddetti chetoacidi dipende non soltanto dalla forza ionica del mezzo (Tab. 1) ma anche dalla natura del tampone usato, come si evince dai dati riportati nella Tabella 2.

**Tabella 2**

Tampone 1 M	$\epsilon$ PPA	$\epsilon$ HPP	$\epsilon$ DHPP
Fosfato pH 8,5	17000	13500	13500
Fosfato pH 8,0	16000	12000	12000
Fosfato pH 7,5	12000	10000	10000
TRIS-HCl pH 8,5	16500	3500	3500
TRIS-HCl pH 8,0	14000	2500	2500
TRIS-HCl pH 7,5	10000	1000	1000
Glicina-NaOH pH 8,5	9000	1300	1200
Glicina-NaOH pH 9,5	7000	600	600
Borato pH 8,5	9000	2200	2000
Borato pH 9,5	8000	2700	2600

**Coefficienti di estinzioni molari dei complessi PPA-PMS, HPP-PMS e DHPP-PMS in vari tamponi.**

A titolo esemplificativo, viene riportato in Fig. 2 lo spettro del complesso PMS-PPA ottenuto in tampone K-fosfato 1 M, PH 8.5. Un identico spettro si ottiene impiegando il PET.

INC. BAZZANO & ZAVARINO ROMA SPA

E' importante notare che alcuni tamponi quali, ad esempio, il TRIS-HCl riducono drasticamente il coefficiente di estinzione dei complessi HPP-PMS e DHPP-PMS lasciando sostanzialmente inalterato quello del complesso PPA-PMS. E' quindi possibile discriminare facilmente la quantità di PPA presente nel campione dalla somma di HPP + DHPP.

I relativi kit diagnostici basati sulla suddetta reazione possono essere vantaggiosamente impiegati per la diagnosi di patologie congenite che sono caratterizzate da inusuali alte concentrazioni ematiche o urinarie di PPA, HPP e DHPP o dei loro corrispondenti amminoacidi, L-fenilalanina, L-tirosina ed L-DOPA.

Forma, pertanto, oggetto specifico della presente invenzione un metodo per la determinazione quantitativa e semiquantitativa degli L-amminoacidi L-fenilalanina, L-tirosina, L-3,4-diidrossifenilalanina e dei loro corrispondenti chetoacidi in un fluido biologico quale, ad esempio, siero o urina, per la diagnosi e il monitoraggio di dismetabolismi congeniti di detti L-amminoacidi comprendente le seguenti fasi:

a) reazione dei chetoacidi presenti nel fluido biologico prelevato, o ottenuti per deamminazione

116

ossidativa dai corrispondenti amminoacidi a loro volta presenti nel fluido biologico prelevato, con un sale organico derivato della fenazina in presenza di almeno un tampone alcalino, con formazione dei corrispondenti complessi a trasferimento di carica;

b) misurazione dell'assorbanza dei complessi a trasferimento di carica ottenuti nella fase a) in un intervallo di lunghezza d'onda compreso tra i 650 e i 690 nm, preferibilmente 663 nm, e determinazione quantitativa della concentrazione di detti amminoacidi o loro corrispondenti chetoacidi nel fluido biologico.

I sali organici derivati della fenazina che possono essere impiegati nel metodo secondo la presente invenzione per la reazione con i chetoacidi corrispondenti ai suddetti amminoacidi sono scelti dal gruppo che consiste in fenazina metosolfato e fenazina etosolfato. Quando il fluido biologico è siero, gli L-amminoacidi in esso presenti sono sottoposti preventivamente a reazione di deamminazione ossidativa condotta per via enzimatica o per via chimica.

Qualora la reazione di deamminazione ossidativa degli L-amminoacidi prevista nel metodo secondo la presente invenzione sia condotta per via enzimatica,

detta reazione avviene ad opera della L-amminoacido ossidasi in ambiente alcalino.

Nel caso specifico in cui l' L-amminoacido sia la L-fenilalanina, la reazione di deamminazione ossidativa viene condotta per via enzimatica ad opera dell'enzima L-fenilalanina deidrogenasi in ambiente alcalino ed in presenza di un cofattore di ossidoriduzione quale, ad esempio, il  $\text{NAD}^+$ .

Inoltre, la reazione di formazione del complesso a trasferimento di carica tra i sali organici e i chetoacidi sopra menzionati avviene in ambiente alcalino mantenuto dalla presenza di almeno un tampone alcalino. Sebbene una molteplicità di tamponi rendono possibile la reazione, gli esempi riportati prevedono l'impiego del tampone sodio fosfato, potassio fosfato e Tris-HCl. Tale reazione può essere condotta sia su un supporto solido che in soluzione.

Secondo una particolare forma di realizzazione del metodo della presente invenzione, dopo la fase a) di formazione dei complessi a trasferimento di carica, questi ultimi possono essere separati mediante, ad esempio, HPLC, e successivamente determinati quantitativamente mediante rivelazione spettrofotometrica.

ING. BATTAGLIA

Come sopra accennato, il metodo secondo la presente invenzione può essere vantaggiosamente impiegato per la diagnosi ed il monitoraggio di dismetabolismi congeniti degli L-amminoacidi L-fenilalanina, L-tirosina, L-3,4-diidrossifenilalanina, detti dismetabolismi essendo, ad esempio, la fenilchetonuria, l'iperfenilalaninemia non-fenilchetonurica, la tirosinosi, il neuroblastoma, nonché il monitoraggio di terapie farmacologiche per il morbo di Parkinson.

Costituiscono ulteriore oggetto della presente invenzione i relativi kit diagnostici basati sulla reazione tra i sali organici dei derivati della fenazina ed i corrispondenti chetoacidi degli L-amminoacidi sopra menzionati. I kit possono essere vantaggiosamente impiegati per la diagnosi ed il monitoraggio di dismetabolismi congeniti degli L-amminoacidi quali, L-fenilalanina, L-tirosina, L-3,4-diidrossifenilalanina mediante la determinazione quantitativa dei corrispondenti chetoacidi e comprendono:

a) un sale organico derivato dalla fenazina quale, ad esempio, fenazina metosolfato e fenazina etosolfato, su supporto solido quale, ad esempio,

dischetti di cellulosa o altri materiali adsorbenti o in soluzione;

b) un tampone alcalino quale, ad esempio, il tampone potassio-fosfato, tale che il coefficiente di estinzione molare dei complessi a trasferimento di carica derivanti dalla reazione tra detti chetoacidi e detto sale organico della fenazina sia superiore a  $13.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 663 nm.

In una forma di realizzazione, il kit comprende ulteriormente un secondo tampone alcalino in grado di ridurre il coefficiente di estinzione molare dei complessi a trasferimento di carica derivanti dalla reazione dei chetoacidi 3-idrossifenilpiruvico e 3,4-diidrossifenilpiruvico con il sale organico derivato dalla fenazina a valori inferiori a  $3.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Detto secondo tampone alcalino in grado di ridurre il coefficiente di estinzione molare dei complessi a trasferimento di carica è scelto, a titolo esemplificativo, nel gruppo che consiste in Tris-HCl, glicina-NaOH e borato.

Infine, detti kit diagnostici possono essere impiegati per la determinazione quantitativa della L-fenilalanina, L-tirosina ed L-DOPA previa conversione enzimatica nei corrispondenti chetoacidi e successiva reazione con i composti fenazinici. In questa forma

preferita di realizzazione detti kit comprendono ulteriormente un enzima per la deamminazione ossidativa di detti L-amminoacidi quale, ad esempio, L-amminoacido ossidasi. Quando, invece, l'L-amminoacido è la L-fenilalanina, l'enzima impiegato può essere la L-fenilalanina deidrogenasi in presenza di un cofattore di ossidoriduzione quale, ad esempio,  $\text{NAD}^+$ .

Alcuni risultati sperimentali ottenuti nell'ambito della presente invenzione, inclusi i saggi biochimico-clinici su supporto solido ed in soluzione per l'analisi semiquantitativa e quantitativa di PPA, HPP e DHPP nei fluidi biologici, sono riportati a titolo esemplificativo, ma non limitativo nel seguito ed illustrati nelle figure allegate, in cui:

la Figura 1 mostra la reazione di formazione del complesso a trasferimento di carica PMS-PPA tra il fenilpiruvico (PPA) e la fenazina metosolfato (PMS);

la Figura 2 mostra gli spettri di assorbimento del PMS (1mM) in tampone K-fosfato 1 M, pH 8.5 e del complesso PMS-PPA ottenuto nello stesso tampone in presenza di PMS 1 mM e PPA 0.1 mM. Il complesso PMS-PPA presenta un  $\lambda_{\text{max}}$  a 663 nm;

la Figura 3 mostra i valori di assorbanza a 663 nm (unità arbitrarie) in funzione della concentrazione di PPA, HPP e DHPP dopo reazione con PMS come riportato nell'esempio 1;

la Figura 4 mostra i valori di assorbanza a 663 nm in funzione della concentrazione di PPA+HPP+DHPP ( $\mu\text{M}$ ) dopo reazione con PMS secondo l'esempio 3;

la Figura 5 mostra i valori di assorbanza a 663 nm in funzione della concentrazione di L-phe+LTyr+L-DOPA ( $\mu\text{M}$ ) trattati secondo l'esempio 5;

la Figura 6 mostra i valori di assorbanza a 663 nm in funzione della concentrazione di L-phe+LTyr+L-DOPA ( $\mu\text{M}$ ) trattati secondo l'esempio 6;

la Figura 7 mostra i valori di assorbanza a 663 nm in funzione della concentrazione di L-phe ( $\mu\text{M}$ ) trattato secondo l'esempio 7;

la Figura 8 mostra i valori di assorbanza a 663 nm in funzione della concentrazione di L-phe+LTyr+L-DOPA ( $\mu\text{M}$ ) trattato secondo l'esempio 8.

Esempio 1: Test su supporto solido per la determinazione semiquantitativa dei chetoacidi fenilpiruvico, 3-idrossifenilpiruvico, 3,4-diidrossifenilpiruvico nelle urine.

a) Preparazione dello stick diagnostico.

I dischetti di cellulosa di 2 cm di diametro vengono immersi in una soluzione 10 mM di PMS (Sigma, USA) disciolto in etanolo assoluto. Dopo 1-2 minuti i dischetti vengono prelevati e asciugati al buio in corrente di aria tiepida (30°C). Una volta essiccati vengono conservati al buio in involucri di fogli di alluminio e se mantenuti a temperatura ambiente sono stabili per almeno 1 anno.

b) Procedura di dosaggio

Il campione urinario in volume pari a 1 ml viene diluito 1:1 con Tampone fosfato 1M a pH 8,5. Mediante micropipetta 0,1 ml del campione urinario così diluito viene depositato sullo stick contenente PMS e preparato come descritto in a).

La presenza di PPA, HPP o DHPP è evidenziata dalla sviluppo del complesso di colorazione azzurro-blu che appare dopo circa un minuto e raggiunge la massima colorazione dopo circa 15 minuti di reazione.

Una determinazione semiquantitativa può essere ottenuta per confronto con una apposita scala cromatica. Il limite inferiore di determinazione corrisponde ad una concentrazione urinaria di chetoacidi pari a 30  $\mu$ M.

Per una determinazione più accurata può essere utilizzato un lettore fotometrico a riflettanza con

filtro a 660 nm. Nella Figura 3 vengono riportati i valori di assorbanza espressi in unità arbitrarie ottenuti con campioni urinari implementati con quantità note dei chetoacidi (PPA+HPP+DHPP) ed i medesimi valori a cui viene sottratto il valore del bianco (Test-BK).

I punti sperimentali riportati nella Fig. 3 rappresentano la media di quattro differenti test effettuati su un medesimo campione urinario con i corrispondenti errori standard.

Esempio 2: *Test su supporto solido per la determinazione semiquantitativa di PPA e di HPP + DHPP nelle urine.*

Una procedura che consente di valutare la concentrazione di PPA e quella di HPP + DHPP prevede il confronto colorimetrico (su scala cromatica oppure con dispositivo fotometrico a riflettanza) tra due sticks preparati come nell' Esempio 1 e fatti reagire con 0,1 ml del campione urinario diluito 1:10 sia in tampone fosfato, 1M, pH 8.5, sia in Tampone TRIS-HCl 1 M a pH 8,5. Quest'ultimo tampone riduce drasticamente l'assorbanza dovuta ai complessi HPP-PMS e DHPP-PMS ( $\epsilon = 3500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) mentre lascia sostanzialmente inalterato il contributo dovuto al PPA. E' possibile ricavare facilmente la

concentrazione di PPA e quella di HPP + DHPP sulla base di un sistema a due equazioni e due incognite. Nella Tabella 4 vengono riportati i valori ottenuti applicando tale procedura a vari campioni implementati di quantità note di PPA e HPP e DHPP.

Tabella 4

PPA ( $\mu\text{M}$ )	HPP+DHPP ( $\mu\text{M}$ )	Assorbanza in T.F. (unità arb.) (Test-BK)	Assorbanza in T.TRIS-HCl (unità arb.) (Test-BK)	PPA Calcolato ( $\mu\text{M}$ )	HPP+DHPP Calcolato ( $\mu\text{M}$ )
100	0	$1.70 \pm 0.05$	$1.60 \pm 0.05$	92	8
0	100	$1.35 \pm 0.05$	$0.30 \pm 0.05$	0	100
50	50	$1.52 \pm 0.05$	$1.05 \pm 0.05$	53	47
100	50	$2.37 \pm 0.04$	$1.87 \pm 0.05$	98	51
150	50	$3.31 \pm 0.05$	$2.72 \pm 0.07$	148	59
50	100	$2.25 \pm 0.03$	$1.20 \pm 0.06$	47	105
100	100	$3.09 \pm 0.06$	$2.10 \pm 0.09$	107	96

**Esempio 3:** Test in soluzione per la  
determinazione semi-quantitativa di PPA, HPP e DHPP.

In due cuvette separate contenenti 0,90 ml di una soluzione 1 mM di PMS in tampone K-fosfato a pH 8,5 (1 M) e EDTA 0,1 mM, vengono aggiunti nella prima 0,1 ml di acqua deionizzata per la preparazione del bianco (BK) e nella seconda 0,1 ml di campioni urinari da analizzare (Test).

Ai valori di assorbanza ottenuti per ciascun saggio vengono sottratti i valori dei corrispondenti

**W.G. BAKER & ZIMMERMAN, SOA**

bianchi (BK). considerando un coefficiente di estinzione medio dei complessi PMS-PPA, PMS-HPP e PMS-DHPP ( $\epsilon = 15.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  a 663 nm), i valori di assorbanza a 663 nm sono proporzionali alla concentrazione dei chetoacidi presenti nel campione urinario, come mostrato in Fig. 4. Il limite inferiore di determinazione dei chetoacidi nella miscela di saggio è pari a 3 nmoli/ml, corrispondente ad una concentrazione di 30 nmoli/ml di chetoacidi urinari. Il saggio fornisce dunque un approssimativo valore somma dei chetoacidi PPA, HPP e DHPP.

Esempio 4: Test in soluzione per la determinazione quantitativa di PPA e di HPP+DHPP nelle urine.

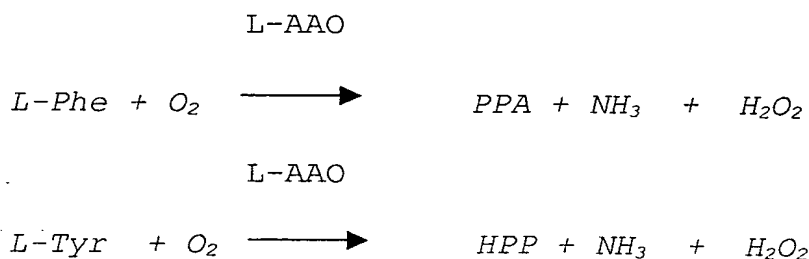
La procedura si basa sul confronto del saggio riportato nell'esempio 3 con un secondo saggio che prevede l'uso di Tampone TRIS-HCl 1 M a pH 8,5 per la diluizione del campione urinario. Tale miscela tampone riduce drasticamente l'assorbanza a 663 nm dovuta ai complessi HPP-PMS e DHPP-PMS ( $\epsilon = 3500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) mentre lascia inalterato il contributo dovuto al PPA. Con un semplice sistema di due equazioni e due incognite è possibile risalire alla concentrazione di PPA e di HPP+DHPP.

I campioni che presentano valori superiori alla media possono essere ulteriormente analizzati mediante procedura HPLC descritta in seguito che permette una accurata quantizzazione di PPA-PMS, HPP-PMS e DHPP-PMS.

Il saggio spettrofotometrico può essere effettuato sia end-point che in cinetica. Il saggio è stato ottimizzato sia su spettrofotometri tradizionali sia su micropiastre a pozzetti multipli mediante lettori fotometrici con filtro a 660 nm. In quest'ultimo caso è previsto un volume finale di 0,3 ml lasciando inalterate le proporzioni dei reagenti.

Esempio 5: *Test su supporto solido per la determinazione quantitativa degli amminoacidi L-fenilalanina + L-tirosina + L-DOPA presenti nel siero umano.*

La concentrazione totale di L-fenilalanina, L-tirosina ed L-DOPA nel siero viene determinata in presenza di L-aminoacido ossidasi (L-AAO) (EC 1.4.3.2) che è in grado di deaminare ossidativamente tali amminoacidi secondo il seguente schema:



ING. BRUNO



I chetoacidi PPA, HPP e DHPP vengono determinati mediante reazione con il PMS o PES su un supporto solido similmente a quanto precedentemente descritto nell'esempio 1.

Un campione contenente 0,5 ml di siero umano come tale o implementato di quantità note ed equimolari di L-fenilalanina, L-tirosina ed L-DOPA viene diluito con un identico volume di tampone K-fosfato 1 M a pH 8,5 ed incubato con 0,2 U di L-aminoacido ossidasi commerciale (SIGMA, USA). Dopo trenta minuti di incubazione a 20 °C, i campioni vengono analizzati deponendo 0,1 ml su uno stick preparato come descritto nell' Esempio 1. Dopo 15 minuti la reazione è completa e lo sviluppo colorimetrico viene valutato mediante apparato fotometrico a riflettanza a 663 nm, come mostrato dai risultati riportati in Fig. 5.

Esempio 6: Test in soluzione per la determinazione quantitativa degli amminoacidi L-fenilalanina + L-tirosina + L-DOPA in siero.

Il campione pari a 0,5 ml di siero umano come tale o implementato di quantità note ed equimolari di

Dopo trenta minuti di incubazione a 20°C, i campioni vengono analizzati spettrofotometricamente a 663 nm ed ai valori di assorbanza misurati vengono sottratti dei valori di assorbanza dei corrispondenti bianchi realizzati incubando i medesimi reagenti in assenza dell'enzima L-aminoacido ossidasi.

I valori di concentrazione totale di L-fenilalanina, L-tirosina ed L-DOPA sono ricavabili considerando un coefficiente di estinzione medio dei complessi PMS-PPA, PMS-HPP e PMS-DHPP ( $\epsilon = 15.000 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$  a 663 nm). Nella Fig. 6 sono riportati i valori di assorbanza ottenuti.

**Esempio 7:** Test su supporto solido per la  
determinazione quantitativa di L-fenilalanina  
presente in siero umano.

La determinazione della sola L-fenilalanina in siero su un supporto solido può essere ottenuta impiegando la procedura descritta nell'esempio 5 sostituendo la L-amminoacido ossidasi con la L-fenilalanina deidrogenasi (Sigma, USA), un enzima che

deamina selettivamente la L-fenilalanina a PPA a pH alcalino in presenza di  $\text{NAD}^+$ .

Si procede con la diluizione di 0,5 ml di siero con un identico volume di tampone K-fosfato 1 M a pH 8,5, successivamente incubati a 37 °C con 1 U di L-fenilalanina deidrogenasi (SIGMA-USA) e 0,4 mM di  $\text{NAD}^+$ . Dopo trenta minuti di incubazione, 0,1 ml del campione vengono depositi su stick preparato come descritto nell'esempio 1. Dopo 15 minuti la reazione è completa e lo sviluppo colorimetrico viene valutato mediante apparato fotometrico a riflettanza a 663 nm come mostrato nella Fig. 7. Nelle condizioni sperimentali impiegate, la cross-reattività della L-tirosina risulta minore dell' 1%.

Esempio 8: Test in soluzione per la determinazione quantitativa di L-fenilalanina nel siero.

Il campione di volume pari a 0,5 ml di siero umano come tale o implementato di quantità note di L-fenilalanina viene diluito con un identico volume di tampone K-fosfato 1 M a pH 8,5 contenente 1 U di L-fenilalanina deidrogenasi (Sigma, Usa), 0,4 mM di  $\text{NAD}^+$  (SIGMA, USA) e PMS (2 mM). Dopo trenta minuti di incubazione a 20 °C, i campioni vengono analizzati spettrofotometricamente a 663 nm in cuvette da 1 cm

di cammino ottico. I risultati sono riportati nella Fig. 8.

Esempio 9: *Dosaggio di fenilalanina su campioni ematici di neonati per la diagnosi precoce della fenilchetonuria.*

La procedura si basa sull'estrazione degli amminoacidi serici da campioni di sangue intero depositati su carta da filtro, conversione enzimatica della L-fenilalanina in PPA mediante L-fenilalanina deidrogenasi in presenza di  $\text{NAD}^+$  e successiva reazione con il PMS per formare il complesso PMS-PPA secondo la procedura riportata nell'esempio 8.

Si procede con il prelievo di 0,1 ml di sangue intero dal tallone del neonato che vengono depositati su dischetti di carta da filtro del diametro di 12,7 mm. Tali campioni, una volta essiccati, possono essere conservati a temperatura ambiente per almeno un mese.

I dischetti vengono immersi per un breve periodo di tempo in metanolo per fissare le proteine alla cellulosa, successivamente essiccati e da essi, mediante apposita punzonatrice, si ricavano degli ulteriori dischetti di 4 mm di diametro. Tali dischetti vengono immersi per 10 minuti in 0,5 ml di

tampone fosfato 1 M a pH 8,5 e tampone TRIS-HCl 1 M a pH 8,5 e mantenuti sotto agitazione.

Quindi, 0,19 ml dell'estratto (E) vengono incubati in micropiasta a pozzetti multipli con 0,04 ml di NAD<sup>+</sup> (0,6 mM), L-fenilalanina deidrogenasi (1 U), e 0,03 ml di PMS (10 mM). Dopo 30 minuti di incubazione a 25 °C, la concentrazione di L-fenilalanina può essere determinata su micropiasta a pozzetti multipli con rivelatore fotometrico provvisto di filtro a 663 nm.

Le letture di assorbanza a 663 nm risultano proporzionali alla concentrazione di L-fenilalanina in un ambito compreso tra 1 mg/dl (0,05 mM) e 15 mg/dl (1 mM).

Il limite inferiore di determinazione corrisponde ad una concentrazione serica di L-fenilalanina di 0,08 mM.

Il saggio descritto è "end point" ma procedure cinetiche che prevedono tempi di analisi inferiori sono anche possibili. Inoltre, a saggio ultimato, è possibile introdurre nel medesimo campione una quantità nota di fenilalanina, da impiegarsi come standard interno. Tale procedura aggiuntiva consente di saggiare l'efficienza del sistema enzimatico e di

Una alternativa particolarmente utile da un punto di vista diagnostico è rappresentata dall'uso di appositi stick di cellulosa sui quali sono stati preventivamente fatti assorbire  $\text{NAD}^+$  (0,4 mM) il PMS (10 mM).

Il campione pari a 0,03 ml di estratto (E), implementato di 0,1 U di L-fenilalanina deidrogenasi, viene depositato sullo stick; dopo 1 ora a temperatura ambiente il complesso PMS-PPA, stechiometrico alla L-fenilalanina serica, può essere determinato quantitativamente con apparato fotometrico a riflettanza con filtro a 660 nm. La lettura di assorbanza al tempo zero viene sottratta alla lettura rilevata dopo un ora. Il limite inferiore di determinazione ed il range di linearità è simile a quello riscontrato con la procedura riportata.

Esempio 10: Procedura di separazione e quantizzazione dei complessi PMS-PPA, PMS-HPP e PMS-DHPP mediante HPLC.

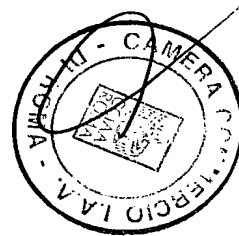
I complessi PMS-PPA, PMS-HPP e PMS-DHPP sono stati separati e determinati quantitativamente impiegando un apparato HPLC con colonna a fase

inversa Ultrasphere C18 (5 $\mu$ m, 80 Å). Si impiega un gradiente lineare che partendo dal 100% di H<sub>2</sub>O, raggiunge il 100% di metanolo in 35 minuti. La lunghezza d'onda del rivelatore spettrofotometrico è fissata a 663 nm. I tre complessi eluiscono come picchi simmetrici e identificati in base al diverso tempo di ritenzione (PMS-PPA = 26 minuti; PMS-HPP = 23 minuti; PMS-DHPP = 21 minuti). Le aree dei picchi di eluizione sono proporzionali alla quantità di chetoacidi ed il limite inferiore di rivelazione è di circa 0,6 nmoli per ml di soluzione.

La presente invenzione quindi riguarda anche esempi di varie applicazioni analitiche finalizzate alla diagnosi di varie patologie umane ed al controllo di terapie farmacologiche.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
**Serena Gitto**  
(N° d'iscr. 962 B)

*Serena Gitto*



ING. BAZZANO & ZANARDI ROMA SpA

RIVENDICAZIONI

RM 2003 A 000556

1. Metodo per la determinazione quantitativa e semi-quantitativa degli L-amminoacidi L-fenilalanina, L-tirosina, L-3,4-diidrossifenilalanina e dei loro corrispondenti chetoacidi in un fluido biologico, per la diagnosi e il monitoraggio di dismetabolismi congeniti di detti L-amminoacidi, comprendente le seguenti fasi:

a) reazione dei chetoacidi presenti nel fluido biologico prelevato, o ottenuti per deaminazione ossidativa dai corrispondenti amminoacidi a loro volta presenti nel fluido biologico prelevato, con un sale organico derivato della fenazina in presenza di almeno un tampone alcalino, con formazione dei corrispondenti complessi a trasferimento di carica;

b) misurazione dell'assorbanza dei complessi a trasferimento di carica ottenuti nella fase a) in un intervallo di lunghezza d'onda compreso tra 650 e 690 nm e determinazione quantitativa della concentrazione di detti amminoacidi o loro corrispondenti chetoacidi nel fluido biologico.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il sale organico derivato della fenazina è scelto dal gruppo che consiste in fenazina metosolfato e fenazina etosolfato.

ARMANDO TESTA SPA

3. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il fluido biologico è siero o urina.
4. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto fluido biologico è siero e gli L-amminoacidi in esso presenti sono sottoposti preventivamente a reazione di deaminazione ossidativa condotta per via enzimatica o per via chimica.
5. Metodo secondo la rivendicazione 4, in cui la reazione di deaminazione ossidativa di detti L-amminoacidi è condotta per via enzimatica, per reazione con l'enzima L-amminoacido ossidasi in ambiente alcalino.
6. Metodo secondo la rivendicazione 4, in cui quando l'L-amminoacido è la L-fenilalanina la deaminazione ossidativa è condotta per via enzimatica per reazione con l'enzima L-fenilalanina deidrogenasi in ambiente alcalino in presenza di un cofattore di ossidoriduzione.
7. Metodo secondo la rivendicazione 6, in cui il cofattore di ossidoriduzione è  $\text{NAD}^+$ .
8. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detti almeno un tampone alcalino sono scelti dal gruppo che consiste in sodio fosfato, potassio fosfato, TRIS-HCl.

9. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la fase a) è condotta su un supporto solido o in soluzione.

10. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detti dismetabolismi consistono in fenilchetonuria, iperfenilalaninemia non-fenilchetonurica, tirosinosi, neuroblastoma, morbo di Parkinson.

11. Kit per la diagnosi e il monitoraggio di dismetabolismi congeniti degli L-amminoacidi L-fenilalanina, L-tirosina, L-3,4-diidrossifenilalanina mediante determinazione quantitativa dei corrispondenti chetoacidi comprendente:

a) un sale organico derivato dalla fenazina su supporto solido o in soluzione;

b) un tampone alcalino tale che il coefficiente di estinzione molare dei complessi a trasferimento di carica derivanti dalla reazione tra detti chetoacidi e detto sale organico della fenazina sia superiore a  $13.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

12. Kit secondo la rivendicazione 11, in cui il sale organico derivato dalla fenazina è scelto dal gruppo che consiste in fenazina metosolfato e fenazina etosolfato.

REDAZIONE

13. Kit secondo la rivendicazione 11, in cui il supporto solido consiste in dischetti di cellulosa o simili supporti adsorbenti

14. Kit secondo la rivendicazione 11, in cui il tampone alcalino b) è il tampone fosfato.

15. Kit secondo la rivendicazione 12, che comprende ulteriormente:

c) un secondo tampone alcalino in grado di ridurre il coefficiente di estinzione molare dei complessi a trasferimento di carica derivanti dalla reazione dei chetoacidi 3-idrossifenilpiruvico e 3,4-diidrossifenilpiruvico con il sale organico derivato della fenazina a valori inferiori a  $3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

16. Kit secondo la rivendicazione 15, in cui detto secondo tampone alcalino c) è scelto nel gruppo che consiste in TRIS-HCl, glicina-NaOH, borato.

17. Kit secondo ognuna delle rivendicazioni da 11 a 16, che comprende ulteriormente:

d) un enzima per la deaminazione ossidativa di detti L-amminoacidi.

18. Kit secondo la rivendicazione 17, in cui l'enzima in cui la reazione di deaminazione ossidativa di detti L-amminoacidi è condotta per via enzimatica, per reazione con l'enzima L-amminoacido ossidasi in ambiente alcalino.

ING. BRUNO G. ZANNO

19. Kit secondo la rivendicazione 17, in cui quando l'L-amminoacido è la L-fenilalanina, l'enzima è L-fenilalanina deidrogenasi in presenza di un cofattore di ossidoriduzione.

20. Kit secondo la rivendicazione 19, in cui il cofattore di ossidoriduzione è  $\text{NAD}^+$ .

Roma, 28 NOV. 2003

p.p.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"

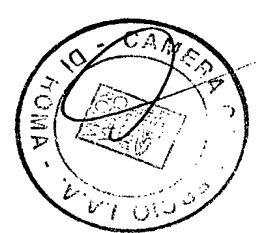
ING. BARZANÒ & ZANARDO ROMA S. p. A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)

SG

*Serena Gitto*

ING. BARZANÒ & ZANARDO ROMA



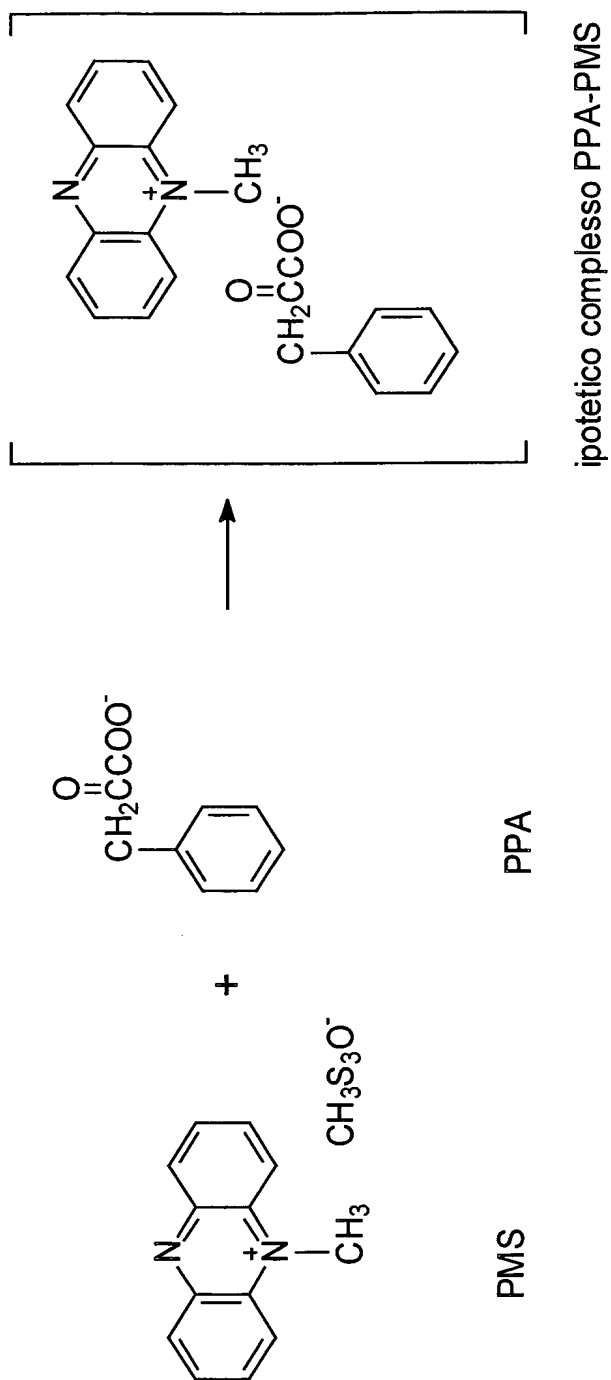
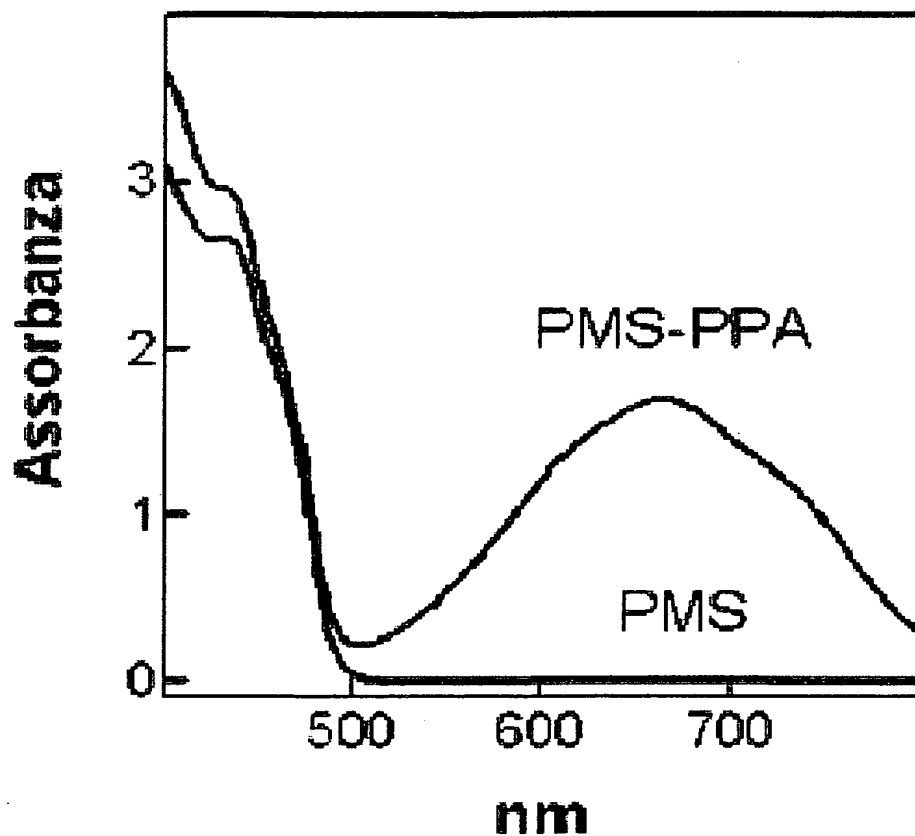


Fig. 1

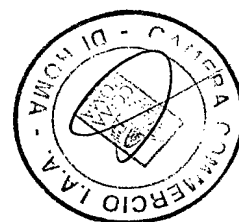
RM 2003 A 000558

**Fig. 2**

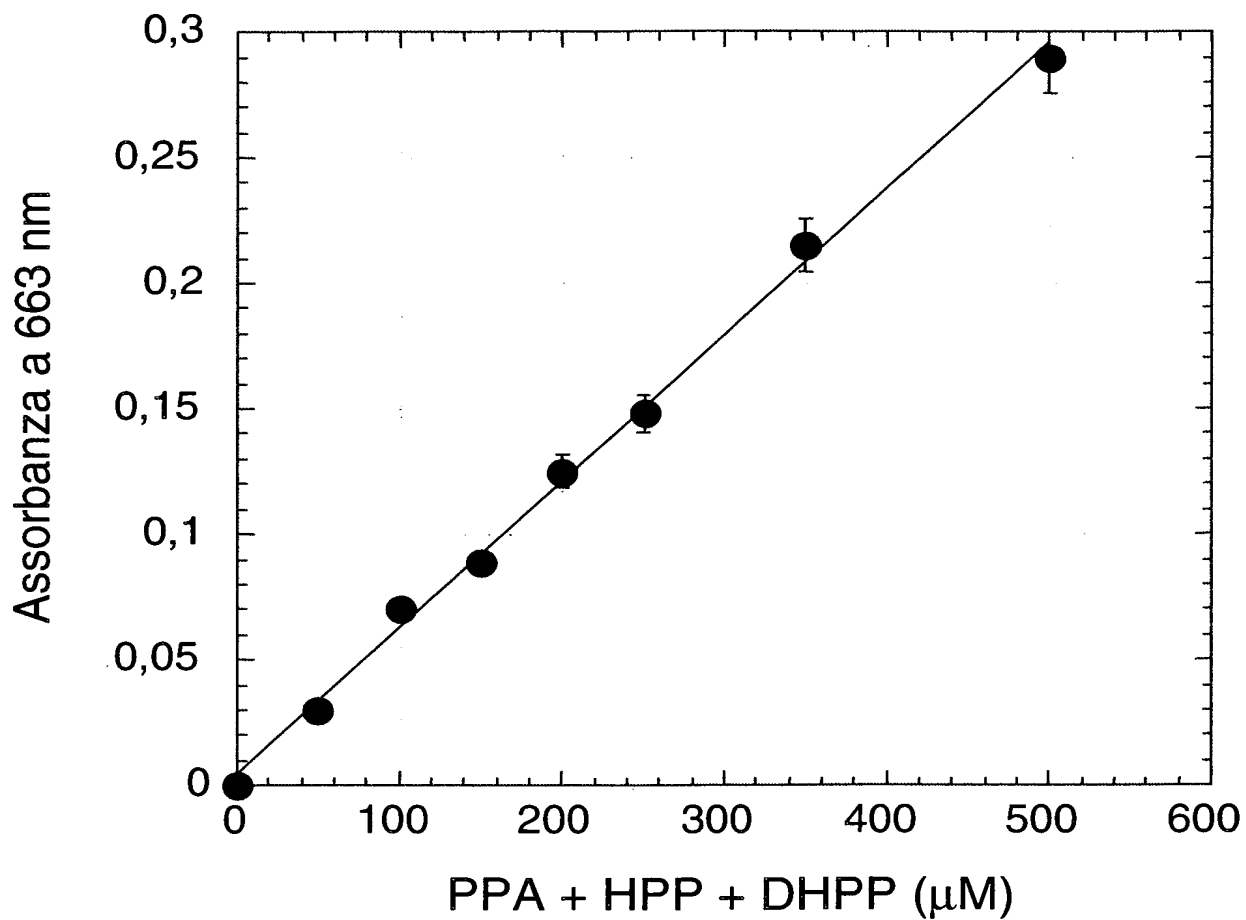
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)

p.p.: Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"  
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

*Serena Gitto*

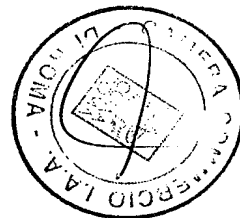


RM 2003 A 000556

**Fig. 3**

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)

p.p.: Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"  
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.



RM 2003 A 000556

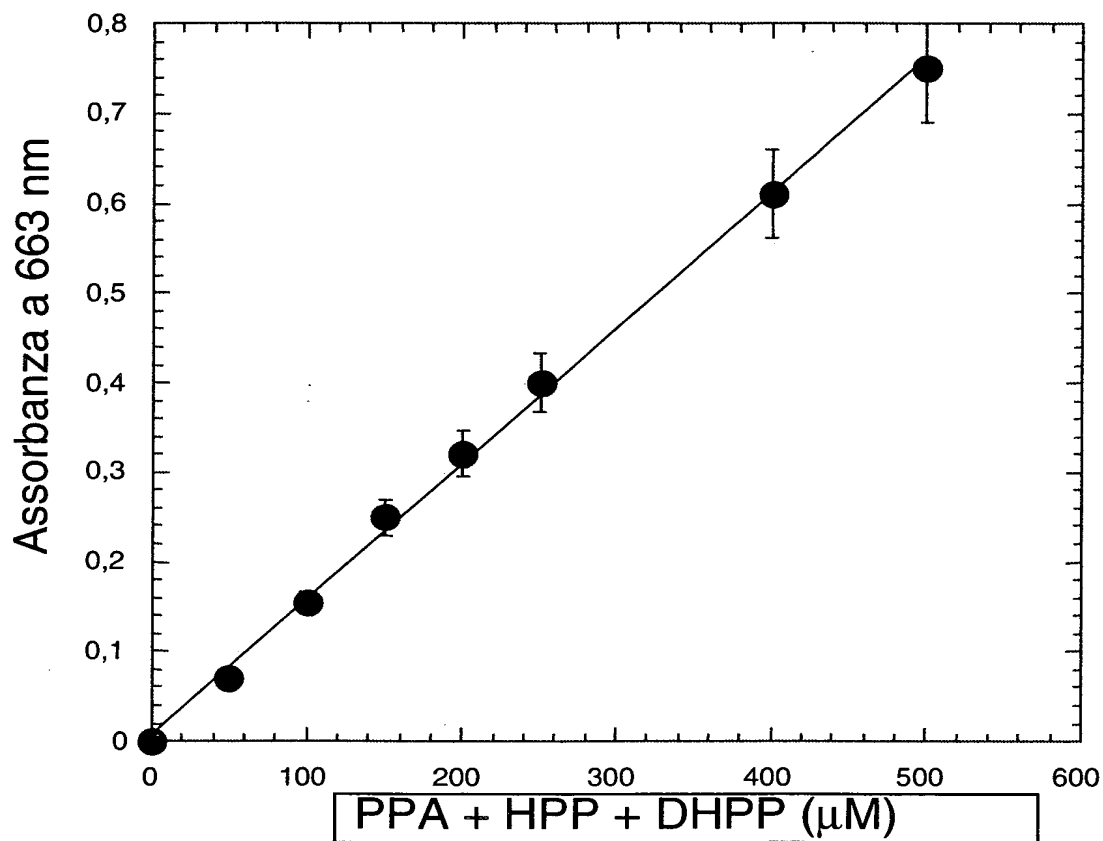
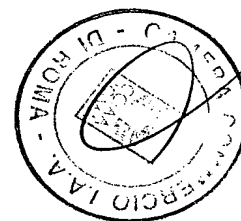
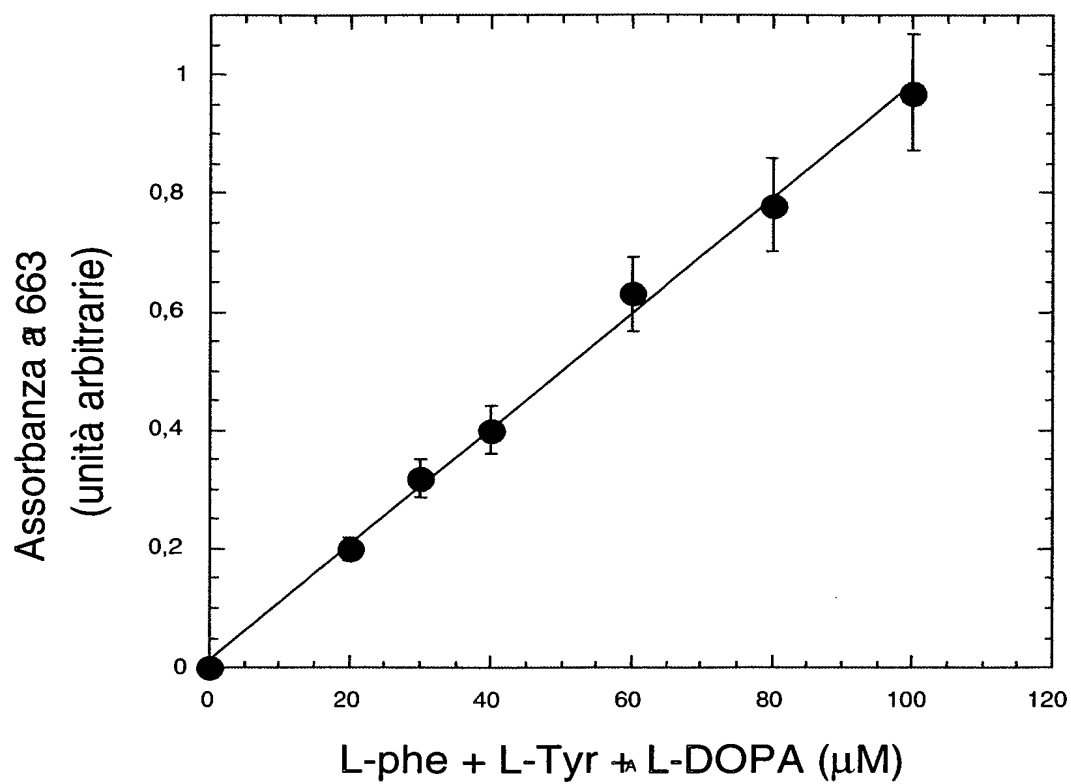


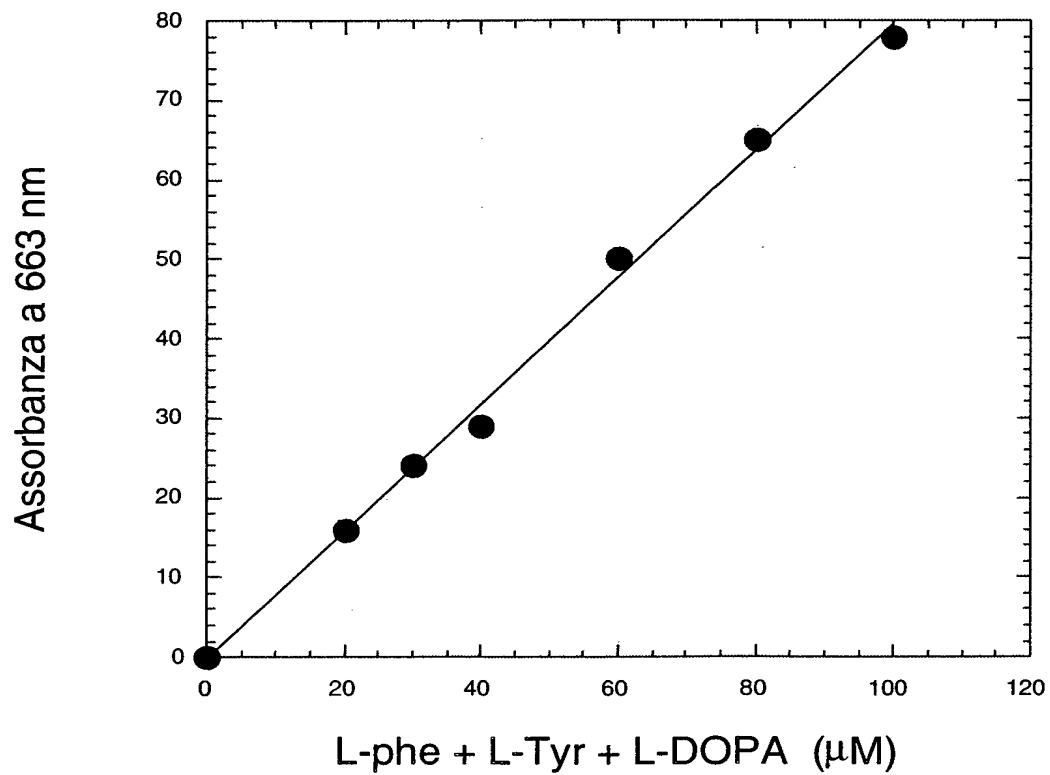
Fig. 4



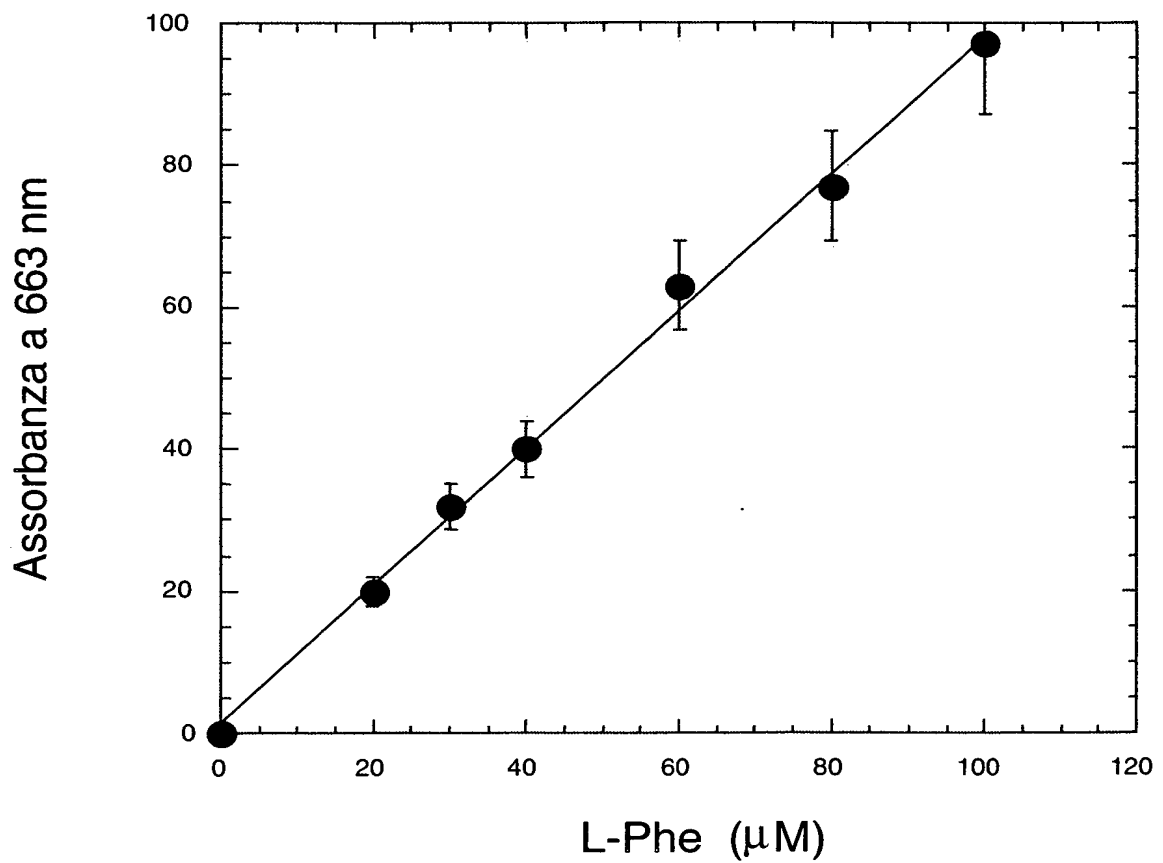
RM 2003 A 000558

**Fig. 5**

RM 2003 A 000556

**Fig. 6**

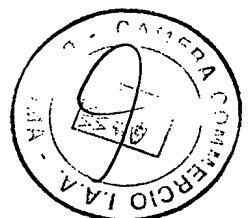
RM 2003 A 000556

**Fig. 7**

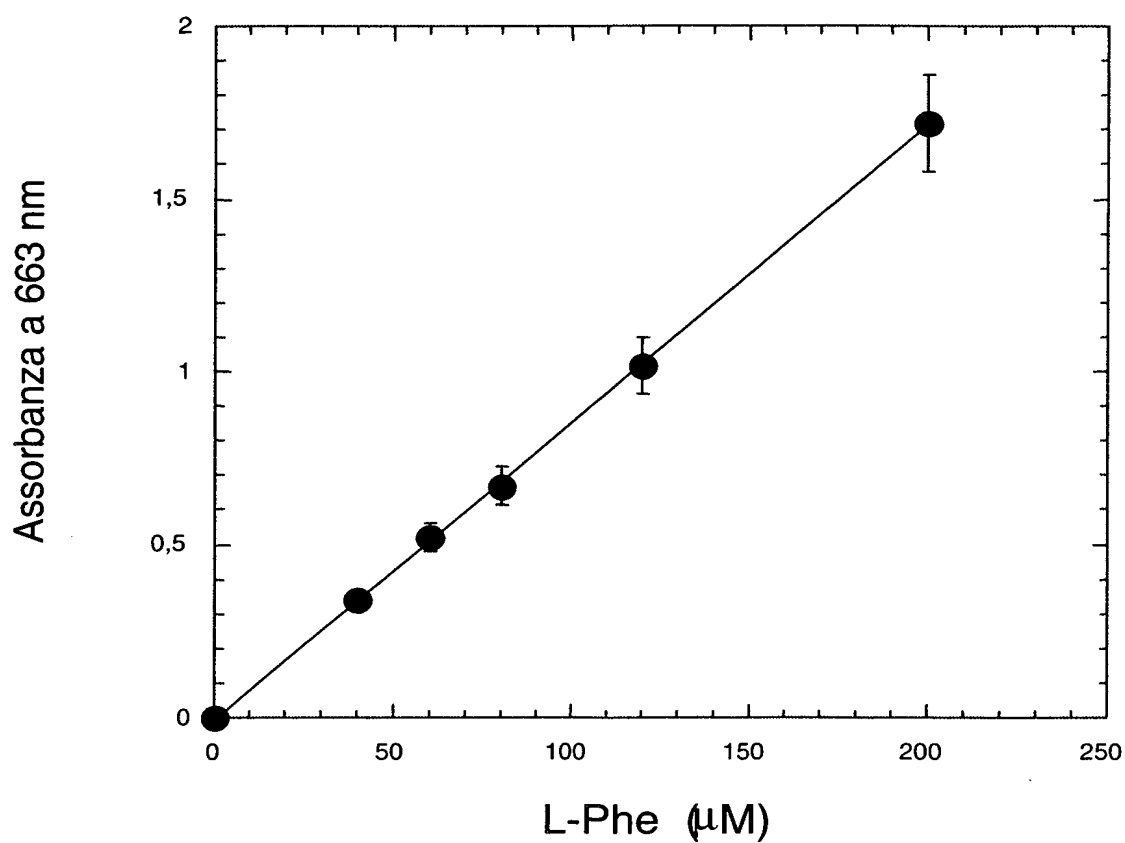
p.p.: Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"  
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
**Serena Gitto**  
(N° d'iscr. 962 B)

*Serena Gitto*



RM 2003 A 000556

**Fig. 8**

p.p.: Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"  
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
**Serena Gitto**  
(N° d'iscr. 962 B)

*Serena Gitto*

